



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103091500 A

(43) 申请公布日 2013.05.08

(21) 申请号 201310062278.7

(22) 申请日 2013.02.28

(71) 申请人 苏州和锐医药科技有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街  
218号纳米科技园B2栋313室

(72) 发明人 朱凡 唐太清 陈菲 霍如松

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种抗体检测试剂盒 (OmpC-IgA)

(57) 摘要

本发明涉及一种检测大肠杆菌外膜孔道蛋白C(OmpC)的IgA抗体的检测检测试剂盒及其检测方法,属于免疫分析检测领域。本发明所提供的OmpC抗体试剂盒包括OmpC包被的微孔板、酶标记的抗人IgA抗体。本发明的检测试剂具有高准确性、高特异性和高灵敏度等特点,可用于检测人体组织抗OmpC IgA抗体,在某些自体免疫性疾病诊断中发挥重要作用。

1. 一种检测大肠杆菌 OmpC IgA 抗体的检测试剂盒,其中包括:包被有 OmpC 的微孔板、酶标记抗人 IgA 抗体、阴性对照品、阳性对照品、底物显色剂、洗涤液、反应终止液、样品稀释液。

2. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述 OmpC 是从大肠杆菌纯化,或通过基因工程方法获得的重组蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述的酶标记抗人 IgA 抗体所用的酶为辣根过氧化物酶。

4. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述的阴性对照品是 OmpC-IgA 阴性人血清经 56°C 1 小时灭活,除菌过滤所得。

5. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述的阳性对照品是 OmpC-IgA 阳性人血清经 56°C 1 小时灭活,除菌过滤,用 10% (v/v) 胎牛血清、0.1% (v/v) Proclin300, pH7.5 的磷酸盐缓冲液 1 : 100 稀释。

6. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述的显色剂含过氧化氢或过氧化脲或类似物以及邻苯二胺或四甲基联苯胺。

7. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述的洗涤液为含 0.05% -0.5% 吐温 -20 磷酸盐或碳酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求 1 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于,所述的样品稀释液为含 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐或碳酸盐缓冲液。

9. 根据权利要求 1 所述的一种检测样品中抗大肠杆菌 OmpC-IgA 的酶联免疫试剂盒,在检测抗大肠杆菌 OmpC-IgA 的酶联免疫中的应用,其步骤是:

(1) 用权利要求 1-8 任一所述的试剂盒进行检测,向 OmpC 包被的酶标板孔中加入对照品或待测样品溶液,再加入酶标记的抗人 IgA 抗体,孵育后洗涤拍干,加入显色剂、终止液,用酶标仪或化学发光仪测定吸光度值;

(2) 分析检测结果。

## 一种抗体检测试剂盒 (OmpC-IgA)

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫分析检测领域。具体而言,本发明涉及一种检测抗大肠杆菌外膜孔道蛋白 C IgA 抗体的免疫分析检测试剂盒。

### 技术背景

[0002] 大肠杆菌是人体肠道内的正常细菌之一,一般情况下不致病。但在某些特殊情况下,当机体对大肠杆菌的某种蛋白过激反应时,可发生腹痛、腹泻等肠炎症状。研究表明,一种病因复杂的非特异性炎症性肠病 ((Inflammatory Bowel Disease, IBD) 与机体对大肠杆菌外膜孔道蛋白 C 的过激反应有关,大约有 50% 的 IBD 患者血清抗 OmpC 的 IgA 抗体比正常人高 2 倍以上,因此,通过检测血清中抗 OmpC 的 IgA 可以辅助诊断 IBD。

[0003] 现有检测 OmpC 抗原的双抗夹心法酶联免疫试剂盒,但没有检测 OmpC 抗体的酶联免疫检测试剂盒。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种方便、灵敏、准确的检测 OmpC 抗体的免疫分析检测试剂盒,具体来说是检测人抗大肠杆菌 OmpC-IgA 抗体的免疫分析检测试剂盒。

[0005] 本发明提供了一种检测 OmpC-IgA 抗体的免疫分析检测试剂盒,该试剂盒包括:包被有 OmpC 的微孔板、酶标记抗人 IgA 抗体、阴性对照品、阳性对照品、显色剂、洗涤液。其中包被微孔板的 OmpC 是用重组的蛋白或者从大肠杆菌纯化所得的蛋白。所述的酶标记抗人 IgA 抗体采用化学方法偶联得到,标记酶为辣根过氧化物酶,所述偶联方法为戊二醛法。

[0006] 用于制备所述酶标板的固相材料,包括但不限于,例如,聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯。载体的形式是微量反应板凹孔。

[0007] 所述的洗涤液为 0.05% -0.5% 吐温 -20 的磷酸盐缓冲液。所述的显色剂由显色剂 A 液和显色剂 B 液组成(例如,体积比为 1:1),显色剂 A 液为过氧化氢或过氧化脲,显色剂 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺。所述的样品稀释液为含 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐或碳酸盐缓冲液,所述的抗体稀释液也为含 0.1% 吐温 -20 的磷酸盐或碳酸盐缓冲液。

[0008] 本发明的另一方面,提供了一种检测血清中抗 OmpC-IgA 含量的方法,包括步骤:

[0009] (1) 用权利要求 1-8 任一所述的试剂盒进行检测,向 OmpC 包被的酶标板孔中加入对照品或待测样品溶液,再加入酶标记的抗人 IgA 抗体,孵育后洗涤拍干,加入显色剂、终止液,用酶标仪或化学发光仪测定吸光度值;

[0010] (2) 分析检测结果。

[0011] 本发明试剂盒的检测原理为:

[0012] 将 OmpC 包被在固相载体上,加入待检测样品或对照品,样品或对照品中的抗 OmpC 抗体就跟固相载体上的 OmpC 蛋白结合,形成抗原-抗体复合物,用洗涤液去除无关的成分,然后加入酶标记的抗人 IgA 抗体,酶标抗体与微孔板上的抗原-抗体结合,形成抗原-抗体-酶标抗体复合物,通过洗涤出去未结合的酶标记物,显色后终止,测定样品的吸光度

值,该值与样品中含抗 OmpC-IgA 抗体的量呈正相关,与阴性对照品和阳性对照品检测所得的值进行比较即可得出样品中是否含有抗 OmpC-IgA 抗体,以及抗体的含量多少。

### 具体实施方式

[0013] 提供下述实施例是为了更好地理解本发明,而不是对本发明的内容和保护范围构成任何限制。

[0014] 实施例 1 大肠杆菌 OmpC 制备

[0015] 试剂及仪器

[0016] 1) 试剂

[0017] 大肠杆菌宿主菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3), 克隆载体 pCR2.1T-vector, 表达质粒 pET28a(+), DNA 聚合酶 rTaq, T4DNA 连接酶, DNA 聚合酶 rTaq、LATAq 以及限制性内切酶 BamH I、Hind III 和 EcoR I、BamH I, DL2000DNA Marker、T4DNA 连接酶, 低分子量标准蛋白, DNA 胶回收试剂盒, IPTG 等

[0018] 2) 仪器

[0019] 普通摇床 SCS-24 ;隔水式恒温电热培养箱 ;Biophotometer 分光光度计、台式冷冻离心机 Centrifuge 5810R、台式离心机 MiniSpin ;高速冷冻离心机 ;蛋白质电泳仪以及凝胶成像系统 ;PCR 仪 ;超声裂解仪 ;恒温金属浴 ;HIS 蛋白纯化柱等。

[0020] 3) 实验方法

[0021] 载体构建

[0022] 设计引物 ATTG GATC CGCT CCGAAAGA 和 TCTC GAGT TAAG CCTG CGGCT 从模板 DNA 中 PCR 扩增出 OmpC 片段, 胶回收试剂盒回收片段后连接到 pCR2.1 克隆载体进行测序鉴定。将鉴定正确的序列克隆至表达载体 pET28a(+) 中, 酶切位点为 EcoR I、BamH I, 同时载体上有 6 $\times$ HIS 标签, 便于后续蛋白纯化。

[0023] 表达

[0024] 将得到的质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3), 通过抗性筛选阳性表达菌株。将筛选出来的阳性菌液按 1 : 1000 的比例接种加有 Kan 抗性的 LB 培养基中, 每个菌接种两管, 一管用于诱导, 另一管用于非诱导对照, 同时要接种一管空质粒菌作对照。37 $^{\circ}$ C 过夜培养至 OD600 值约为 0.4-0.6 时, 诱导管和空质粒对照管加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L, 非诱导对照不加, 最终选择表达能力高的两个菌, 用于大量的蛋白的表达。并按照常规的 SDS-PAGE 方法对表达产物进行鉴定。

[0025] 纯化

[0026] 将表达的产物用 HIS 蛋白纯化柱纯化蛋白, 经测定纯化后的蛋白浓度为 403mg/L。

[0027] 实施例 2 酶标抗人 IgA 抗体制备

[0028] 辣根过氧化物酶标记抗抗体 :将抗人 IgA 抗体与辣根过氧化物酶通过戊二醛法进行偶联得到酶标记抗人 IgA 抗体。方法是将 10mgHRP 溶于 0.2ml 含 1.25% 戊二醛的 PH6.80. mol/LPBS 中,

[0029] 将 10mg HRP 溶于 0.2mol/LpH5.6 醋酸盐缓冲液 1ml 中, 溶解混匀, 后加入 0.1mol/L NaIO<sub>4</sub> 溶液 1ml, 混匀, 置冰箱 20min, 取出加入 0.4mol/L 乙二醇溶液 0.5ml, 室温放置 30min 后, 加入含 5mg 抗人 IgA 抗体的水溶液 (或 PBS) 1ml, 混匀并装透析袋, 以 0.05mol/L、

pH 值 9.6 碳酸钠缓冲液缓慢搅拌透析 6h (或过夜) 使之结合, 然后取出加 NaBH<sub>4</sub> 溶液 (5mg/ml) 0.2ml, 置冰箱 2h。将上述结合物混合液加入等体积饱和硫酸铵, 冰箱放置 30min, 离心, 取上清, 将所得沉淀物溶于少许 0.02mol/L、pH 值 7.4PBS 中, 并对之透析过夜。次日再离心除去不溶物, 即得酶抗体结合物。用 0.02mol/L、pH 值 7.4PBS 加至 5ml, 进行测定后, 冷冻干燥或低温保存。加 60% 甘油 PBS, 分装保存备用。

[0030] 实施例 3 微孔板包被

[0031] 包被缓冲液 : pH9.60.5mol/L 的碳酸氢钠缓冲液

[0032] 封闭液 : 1% BSA (牛血清白蛋白) 的 PBS 溶液

[0033] 用包被缓冲液将 OmpC 稀释, 每孔加入 100uL, 37℃ 温育 2h 或 4℃ 过夜; 倾去包被液, 用洗涤液洗涤 5 次, 每次 1min; 拍干, 然后在每孔中加入 200uL 封闭液, 37℃ 温育 2h; 倾去孔内液体, 干燥后用铝膜真空密封保存。

[0034] 实施例 4 免疫分析检测方法建立

[0035] 4.1 确定最佳酶标抗人 IgA 抗体反应浓度

[0036] (1) 用 100ng/ml 人 IgA 进行包被, 洗涤

[0037] (2) 将酶标抗人 IgA 抗体用稀释液作一系列稀释后分别加入已包被的孔中, 保温, 洗涤。

[0038] (3) 加底物显色。加酸终止反应后, 在酶标仪读取吸光度 (450nm)。取 OD 值为 1.0 时的酶标抗人 IgA 抗体的工作浓度为最佳浓度。试验数据列于表 1。

[0039] 表 1

复孔 \ 滴度	1:400	1:1000	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000	1:10000	0
[0040] 1	2.912	2.696	2.326	1.785	1.175	0.634	0.345	0.049
2	2.985	2.752	2.255	1.743	1.211	0.719	0.395	0.053
3	3.123	2.723	2.143	1.6992	1.189	0.728	0.290	0.046

[0041] 由表 1 数据中可以确定, 酶标抗体的工作浓度为 1 : 6000 稀释度时, OD<sub>450nm</sub> 值在 1.0 左右, 所以最佳酶标抗人 IgA 抗体的工作浓度为 : 1 : 6000

[0042] 4.2 包被抗原浓度的优选

[0043] 将包被抗原按 80.0 μg/mL, 40.0 μg/mL, 20.0 μg/mL, 10.0 μg/mL, 5.0 μg/mL, 2.5 μg/mL, 1.25 μg/mL, 0.625 μg/mL 的系列稀释度包被酶标板, 100 μL/孔, 0 ~ 4℃ 放置过夜, 用洗涤液洗板三次, 每次拍干; 200 μL/孔封闭溶液封闭, 室温放置 3 小时, 洗板三次, 每次拍干; 加入 100 μL/孔阳性阴性抗体 ((1 : 100), 室温放置 2 小时, 洗板三次, 每次拍干; 加入 100 μL/孔的工作浓度的酶标抗人 IgA 抗体, 室温放置 1 小时, 洗板三次, 每次拍干; 加入 100 μL/孔的底物显色液, 加酸终止反应后测定发光值。数据列于表 2。

[0044] 表 2

	80.0	40.0	20.0	10.0	5.0	2.5	1.25	0.625
[0045] 阳性	1.752	1.532	1.502	1.301	1.063	0.920	0.784	0.664
阴性	0.511	0.344	0.281	0.233	0.121	0.010	0.078	0.095
P/N	3.4	4.6	5.3	5.6	8.7	9.2	10.0	7.0

[0046] 由表 2 数据中可以确定在 5.0 μg/mL 的包被抗原, 阳性血清 OD 值为 1.0 左右, 且

阴性血清 OD 值较低,故我们可以确定最佳包被抗原浓度为  $5.0 \mu\text{g/mL}$ 。

[0047] 4.3 阴阳性临界值的确定

[0048] 按优化的数值测定所有的阴性阳性对照品,根据  $P/N \geq 2.1$ ,可确定阴阳临界值为 0.255,为便于判断,以 0.25 作为临界值。

[0049] 实施例 5 样品中抗 OmpC-IgA 的检测

[0050] 5.1 用试剂盒进行检测

[0051] (1) 向抗原包被的酶标板微孔中加入待检样品 100 $\mu\text{l}$ 。同时阳性对照和阴性对照各加 2 孔,每孔 100 $\mu\text{l}$ 。摇匀,置 37C 温育 45 分钟。

[0052] (2) 弃去孔中溶液加入洗涤液 200 $\mu\text{l}$ /孔,静置 3 分钟倒掉,重复洗板 5 次,用吸水纸拍干。

[0053] (3) 每孔加酶标抗体 100 $\mu\text{l}$ ,置 37C 温育 20 分钟后加洗涤液洗板 5 次,吸水纸拍干。

[0054] (4) 每孔加显色液 A 显色液 B 各 50 $\mu\text{l}$ ,混匀,室温避光显色 15 分钟,加终止液 50 $\mu\text{l}$ ,轻轻震荡混匀,用酶标仪测定每孔的吸光度值 (OD 值)。

[0055] 5.2 结果分析

[0056] 由表 3 结果可看出正常人,病人得出的 OD 值均符合阴阳临界值 0.25。

[0057] 表 3

[0058]

质控品	OD (复孔)		样本	OD (复孔)	
阳性	0.454	0.449	正常人 1	0.335	0.341
阳性	0.395	0.401	正常人 2	0.298	0.288
阴性	0.122	0.135	病人 1	0.201	0.198
阴性	0.098	0.101	病人 2	0.185	0.186

专利名称(译)	一种抗体检测试剂盒(OmpC-IgA)		
公开(公告)号	<a href="#">CN103091500A</a>	公开(公告)日	2013-05-08
申请号	CN201310062278.7	申请日	2013-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	苏州和锐医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州和锐医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州和锐医药科技有限公司		
[标]发明人	朱凡 唐太清 陈菲 霍如松		
发明人	朱凡 唐太清 陈菲 霍如松		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/535 G01N21/76		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测大肠杆菌外膜孔道蛋白C(OmpC)的IgA抗体的检测检测试剂盒及其检测方法，属于免疫分析检测领域。本发明所提供的OmpC抗体试剂盒包括OmpC包被的微孔板、酶标记的抗人IgA抗体。本发明的检测试剂具有高准确性、高特异性和高灵敏度等特点，可用于检测人体组织抗OmpC IgA抗体，在某些自体免疫性疾病诊断中发挥重要作用。

复孔	浓度	1:400	1:1000	1:2000	1:4000	1:6000	1:8000	1:10000	0
1		2.912	2.696	2.326	1.785	1.175	0.634	0.345	0.049
2		2.985	2.752	2.255	1.743	1.211	0.719	0.395	0.053
3		3.123	2.723	2.143	1.6992	1.189	0.728	0.290	0.046